

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivona Trtinjak

**STABILNOST I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST GLUKOZIL
HESPERIDINA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za tehnologiju voća i povrća
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij prehrambenog inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Kemija hrane

Tema rada je prihvaćena na X redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 13. srpnja 2017.

Mentor: prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Pomoć pri izradi: -

Stabilnost i antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina

Ivona Trtinjak, 372-DI

Sažetak:

U ovom radu ispitivana je stabilnost i antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina. Antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina je uspoređena s katehinom i kvercetinom nakon pripreme uzoraka ali i tijekom skladištenja pod različitim uvjetima. Ujedno je ispitivan i utjecaj šećera (saharoze, maltoze i trehaloze) na antioksidativnu aktivnost glukozil hesperidina, te njihov utjecaj tijekom zagrijavanja na 60 °C, 80 °C i 100 °C. Za određivanje antioksidativne aktivnosti korištene su DPPH, ABTS i CUPRAC metode. Usporedbom glukozil hesperidina s katehinom i kvercetinom utvrđeno je da je antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina znatno niža u odnosu na druge dvije fenolne komponente, bez obzira na primijenjenu metodu određivanja antioksidativne aktivnosti. Tijekom skladištenja najmanja promjena antioksidativne aktivnosti utvrđena je za otopinu glukozil hesperidina. Rezultati pokazuju da je vrlo važna metoda koja se koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti, ali i da antioksidativna aktivnost ovisi o tipu šećera, načinu skladištenja te temperaturi zagrijavanja.

Ključne riječi: glukozil hesperidin, antioksidativna aktivnost, šećeri, fenoli

Rad sadrži: 48 stranica
16 slika
10 tablica
0 priloga
56 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|--|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. <i>Anita Pichler</i> | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Mirela Kopjar</i> | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. <i>Daniela Čačić Kenjeric</i> | član |
| 4. prof. dr. sc. <i>Nela Nedić Tiban</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 9. listopada 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of food technology
Subdepartment of technology of fruits and vegetables
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate study of Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Food chemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X held on July 13, 2017.

Mentor: *Mirela Kopjar*, PhD, full prof.

Technical assistance: -

Stability and antioxidant activity of glucosyl hesperidin

Ivona Trtinjak, 372-DI

Summary:

In this study, investigation of stability and antioxidant activity of glucosyl hesperidin was investigated. Antioxidant activity of glucosyl hesperidin was compared with catechin and quercetin, after preparation of samples and during storage under different conditions. Also, influence of sugars (sucrose, maltose and trehalose) on antioxidant activity of glucosyl hesperidin and influence of temperature (60 °C, 80 °C and 100 °C) was investigated. For determination of antioxidant activity DPPH, ABTS and CUPRAC methods were used. Comparison of glucosyl hesperidin with catechin and quercetin revealed that antioxidant activity of glucosyl hesperidin was much lower than antioxidant activity of other two phenolic compounds, regardless of used methods. During storage, the lowest decrease of antioxidant activity was determined for glucosyl hesperidin. Results showed that method for determination of antioxidant activity is very important, but also antioxidant activity depends on type of sugar, storage conditions and temperature.

Key words: glucosyl hesperidin, antioxidant activity, sugars, phenols

Thesis contains: 48 pages
16 figures
10 tables
0 supplements
56 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Anita Pichler</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Mirela Kopjar</i> , PhD, full prof. | supervisor |
| 3. <i>Daniela Čačić Kenjeric</i> , PhD, full prof. | member |
| 4. <i>Nela Nedić Tiban</i> , PhD, full prof. | stand-in |

Defence date: October 9, 2017

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio	3
2.1. Polifenoli.....	4
2.1.1. Struktura polifenola	5
2.1.2. Antioksidativna aktivnost.....	8
2.1.3. Veza između strukture i antioksidativne aktivnosti	10
2.2. Šećeri	12
2.2.1. Maltoza.....	12
2.2.2. Saharoza	13
2.2.3. Trehaloza	14
2.4. Glukozil hesperidin	15
2.4.1. Proizvodnja glukozil hesperidina.....	16
2.4.2. Primjena glukozil hesperidina	18
3. Eksperimentalni dio	20
3.1. Zadatak.....	21
3.2. Materijali	22
3.2.1. Priprema uzoraka	22
3.3. Metode.....	23
3.3.1. Metode za određivanje antioksidativne stabilnosti.....	23
3.3.2. Metode redukcije metalnih iona.....	25
4. Rezultati i rasprava	26
4.1. Utjecaj skladištenja i usporedba s katehinom i kvercetinom.....	27
4.2. Utjecaj dodatka šećera i skladištenja	31
4.3. Utjecaj zagrijavanja i dodatka šećera	35
5. Zaključci	39
6. Literatura	42

1. UVOD

Vrlo važnu skupinu tvari u ljudskoj prehrani čine tvari koje posjeduju antioksidativnu aktivnost. To su molekule koje mogu reagirati sa slobodnim radikalima i prekinuti lanac reakcije prije oštećenja molekule. Vitamini i polifenoli su poznati kao komponente u voću i povrću koji posjeduju antioksidativnu aktivnost (Skupień i Oszmiański, 2004).

Jedna od fenolnih komponenta je hesperidin koji se nalazi u citrusima. Kao i ostale fenolne komponente posjeduje antioksidativna svojstva te mu je pripisan potencijalan pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Hesperidin je gotovo netopljiv u vodi što ograničava njegovu širu primjenu pa je upravo iz tog razloga sintetiziran spoj glukozil hesperidin koji je topljiv u vodi. Njegova primjena je vrlo široka te se često nalazi u raznim začinima, konditorskim proizvodima zapadnog stila, japanskim slasticama, sladoledima, alkoholnim i bezalkoholnim pićima. Može se koristiti kao konzervans, stabilizator te kao sredstvo za bojanje proizvoda zbog svoje blijedo žute boje. Osim u prehrambenoj industriji primjenu pronalazi u farmaceutskoj te kozmetičkoj industriji.

Antioksidativne tvari u prehrambenim proizvodima utječu na njihovu kvalitetu stoga je neophodno poznavati njihovu stabilnost kao i čimbenike koji dovode do narušavanja iste, bilo tijekom procesiranja ili tijekom skladištenja.

Cilj ovog rada bio je ispitati stabilnost glukozil hesperidina tijekom termičkog tretiranja na 60 °C, 80 °C i 100 °C, kao i tijekom skladištenja (mjesec dana i tri mjeseca) kroz određivanje antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina. Stabilnost glukozil hesperidina bit će uspoređivana s antioksidativnom aktivnosti i stabilnosti otopina katehina i kvercetina. Tijekom skladištenja glukozil hesperidina bit će praćen utjecaj disaharida (saharoze, maltoze i trehaloze) na njegovu stabilnost. Ujedno će biti i ispitan utjecaj uvjeta skladištenja (pri sobnoj temperaturi na svjetlu odnosno tami, te pri 4 °C) na antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost određivat će se pomoću tri metode: DPPH, ABTS i CUPRAC metode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOLI

Polifenoli su esencijalni spojevi u manjoj ili većoj mjeri svakodnevno prisutni u prehrani. Nastaju kao sekundarni metaboliti biljnog podrijetla a čine skupinu kojoj pripada više od 8 000 različitih spojeva od jednostavnih hidroksimetilnih kiselina i antocijana (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina čije je osnovno obilježje prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Šubarić i sur., 2010; Blasco i sur., 2005).

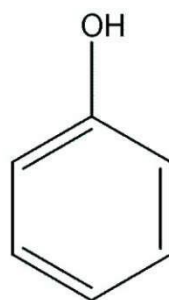
Pored voća i povrća, značajan izvor polifenola su i prerađevine na bazi voća i povrća (vino, sokovi...) te neke druge namirnice kao što su kakao i čaj (posebno zeleni) (**Tablica 1**) (Šubarić i sur., 2010). U posljednje vrijeme pridaje im se velika pažnja zahvaljujući antioksidativnom kapacitetu (hvatanje slobodnih radikala i stvaranje helata s metalima) i mogućem pozitivnom utjecaju na zdravlje, kao i u tretiranju i prevenciji tumora, kardiovaskularnih bolesti i dr. (Robles-Sardin i sur., 2010). U biljkama ovi spojevi djeluju antimikrobno, kao fotoreceptori, kao agensi za privlačenje pozornosti (Kazazić, 2004).

Tablica 1 Sadržaj polifenola u različitim namirnicama (Gharra, 2009)

Izvor	Sadržaj polifenola (mg/kg ili mg/L)	Vrsta polifenola
Borovnica	30-160	Flavonoli
Ribizla	30-70	
Marelica	25-50	
Jabuka	20-40	
Crno grožđe	15-40	
Rajčica	2-15	
Cherry rajčica	115-200	
Poriluk	30-225	
Žuti luk	350-1200	
Kelj	300-600	
Crni čaj	30-45	
Zeleni čaj	20-35	
Crno vino	2-30	
Sok od naranče	215-685	Flavoni
Sok od grejpa	100-650	
Sok od limuna	50-300	
Peršin	240-1850 20-140	
Celer	800-1800	
Sojino brašno		
Kupina	80-270	Hidroksibenzojeva kiselina
Malina	60-100	
Jagoda	20-90	
Grah	350-550	Monomerni flavnoli
Marelica	100-250	
Trešnja	50-220	
Grejp	30-175	
Breskva	50-140 130	
Kupina	60-500	
Crni čaj	80-300	
Crno vino		
Patlidžan	7500	Antocijani
Kupina	1000-4000	
Ribizla	250-5000	
Crno grožđe	300-7500	
Trešnja	350-7500	
Rabarbara	2000	

2.1.1. Struktura polifenola

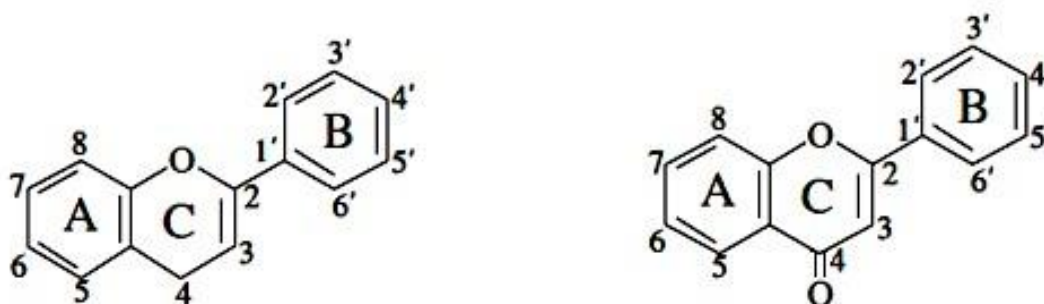
Fenoli (**Slika 1**) su spojevi koji posjeduju jedan ili više aromatičnih prstenova, u ovom slučaju benzen, na kojem se nalaze jedna ili više hidroksilnih grupa (Huang i sur., 2009).



Slika 1 Fenol (Vermerris i Nicholson, 2006)

Najčešća kategorizacija polifenola temelji se na strukturi aglikona (Tsao, 2010) i to najčešće na flavonoide i neflavonoide.

Flavonoidi su najvažnija, a ujedno i najveća skupina polifenola (Mattila i sur., 2006). Struktura flavonoida temelji se na flavonoidnoj jezgri koja se sastoji od tri fenolna prstena (A, B i C prsten). Benzenski prsten A kondenziran je sa tročlanim alifatskim nizom koji zajedno sa kisikom tvori šesteročlani prsten C, a na poziciji 2 prstena C nalazi se benzenski prsten B. Za flavonoide koji imaju vezanu karbonilnu skupinu na C-4 atomu prstena C često se koristi izraz 4-okso-flavonoidi. Osnovna struktura flavonoida prikazana je na **Slici 2**.



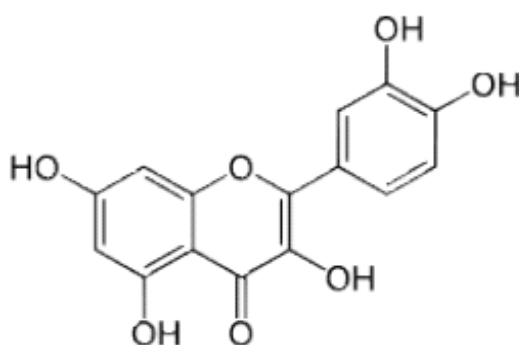
Slika 2 Osnovna struktura flavonoida (Rein, 2005)

(lijevo - flavan jezgra; desno - okso flavonoid jezgra)

Flavonoidi su podijeljeni u nekoliko podgrupa: flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavanonoli, flavani, flavanoli, halkoni, dihidrohalkoni, flavan-3,4-dioli te antocijani. U prirodi se najčešće nalaze u obliku glikozida, tj. povezani su sa različitim molekulama šećera.

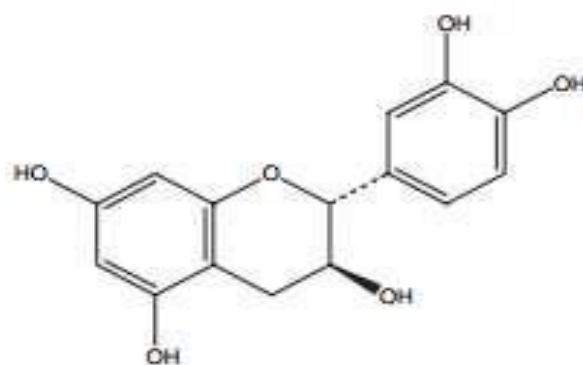
Supstitucijske skupine koje se nalaze na osnovnoj jezgri, osim šećera, su hidroksilna skupina te metoksi skupina što pridonosi velikoj raznolikosti i velikom broju tih spojeva (Jakobek, 2007). Uglavnom se sintetiziraju iz cinamične kiseline koja nastaje iz fenilalanina djelovanjem L-fenilalanin amonij liaze (Michalak, 2006).

Kvercetin (Slika 3) i njegovi glikozidi najrasprostranjeniji su flavonoli. Nalaze se u različitoj hrani kao što su luk, višnja, brokula, rajčica, kelj, čaj, vino, kumin i heljda (Huang i sur., 2009).



Slika 3 Kvercetin (Web 4)

Katehin (Slika 4) prema podjeli pripada flavanolima te je također zastupljen u biljkama. Nalazi se u čaju, jabukama, kakau i raznim bobicama (Huang i sur., 2009).



Slika 4 Katehin (Huang i sur., 2009)

U neflavonoidne spojeve ubrajaju se: fenolne kiseline, fenolni amidi te još neki spojevi za koje se smatra da imaju pozitivan učinak na zdravlje (Tsao, 2010). Razlikujemo dvije glavne vrste fenolnih kiselina: derivati benzojeve kiseline i derivati cinamične kiseline (Tsao, 2010; Gharras, 2009). Nalaze se u obrađenoj hrani (Gharras, 2009) te voću i povrću u slobodnom obliku, no češće se nalaze u vezanom obliku i kao takve nalaze se u žitaricama i sjemenkama, osobito u ljusci (Tsao, 2010).

2.1.2. Antioksidativna aktivnost

Antioksidansi su grupe različitih prirodnih i sintetskih spojeva koji usporavaju ili spriječavaju oksidaciju drugih spojeva (Knight, 1995). Antioksidansi su molekule koje mogu reagirati sa slobodnim radikalima i prekinuti lanac reakcije prije oštećenja molekule. Konzumacijom hrane i pića bogatih antioksidansima stanica može stvoriti antioksidanse kroz cirkulaciju. Vitamini i polifenoli su poznati kao prehrambene komponente u voću i povrću koji posjeduju antioksidativnu aktivnost (Skupień i Oszmiański, 2004).

Antioksidansi u hrani se mogu definirati kao bilo koji sastojak koji može odgoditi, zaustaviti ili spriječiti kvarenje hrane ili stvaranje nepoželjne arome kao posljedice oksidacije. Ukoliko se antioksidansi dodaju nakon tog vremena oni nemaju nikakvo djelovanje s obzirom da je do kvarenja već došlo.

Osim antioksidanasa koji se nalaze u hrani postoje i drugi različiti kemijski spojevi, koje ne možemo normalno dobiti iz hrane, a sadrže antioksidativna svojstva. Antioksidansi su tipične fenolne tvari, dok su neki od antioksidansa enzimi i proteini (Shi i sur., 2001). Iako su prirodni antioksidansi vrjedniji, učinkovitiji i sigurniji od sintetskih, sintetski se u praksi koriste kao aditivi, nadomjesci i lijekovi.

Antioksidativna aktivnost ovisi o mnogo čimbenika kao što su sastav lipida, koncentracija antioksidansa, temperatura, prisustvo drugih antioksidansa. Također ovisi o prisutnosti drugih sastojaka hrane kao što su proteini i voda (Pokorny, 2001).

Antioksidansi mogu inhibirati ili usporiti oksidaciju na dva načina: ili uklanjanjem slobodnih radikala, u tom slučaju se sastojak definira kao primarni antioksidans, ili mehanizmom koji ne uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala, u tom slučaju sastojak se definira kao sekundarni antioksidans.

Primarni antioksidansi su fenolne tvari. Sekundarni antioksidansi djeluju putem različitih mehanizama. Uobičajeno je da sekundarni antioksidansi pokazuju antioksidativnu aktivnost samo u prisustvu neke druge manje komponente, npr. limunska kiselina postaje aktivna samo u prisustvu metalnih iona, a askorbinska kiselina je aktivna u prisustvu tokoferola ili nekih drugih primarnih antioksidanasa (Gordon, 2001).

Najznačajniji mehanizam djelovanja antioksidanasa je njihova reakcija sa slobodnim radikalima lipida tvoreći tako inaktivne produkte. Aditivi s ovim svojstvom su antioksidansi u pravom smislu. Obično oni reagiraju s peroksi ili alkoksi slobodnim radikalima koji nastaju raspadanjem lipidnih hidroperoksida. Drugi inhibitori stabiliziraju lipidne hidroperoksidge sprečavajući njihovo raspadanje na slobodne radikale. Raspadanje hidroperoksidge je katalizirano teškim metalima koji djeluju kao helirajući agensi inhibirajući oksidaciju. Neke tvari odnosno sinergisti posjeduju antioksidativnu aktivnost, ali mogu poboljšati aktivnost pravih antioksidanasa. Druga grupa spojeva razgrađuje lipidne hidroperoksidge ne stvarajući radikale već smanjujući sadržaj slobodnih radikala. Singleton kisik oksidira lipide mnogo brže nego triplet kisik, tako da tvari koje vežu singleton kisik imaju važan inhibirajući učinak na oksidaciju lipida (Pokorny, 2001).

Određivanje antioksidativne aktivnosti provodi se pomoću:

- ABTS+ metoda [radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)] (Arts i sur., 2001),
- DPPH metoda (reakcija s 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom) (Brand-Williams i sur., 1995),
- FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power) (Benzie i Strain, 1996),
- ORAC metoda (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Cao i sur., 1993) i
- TEAC metoda (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Miller i sur., 1993).

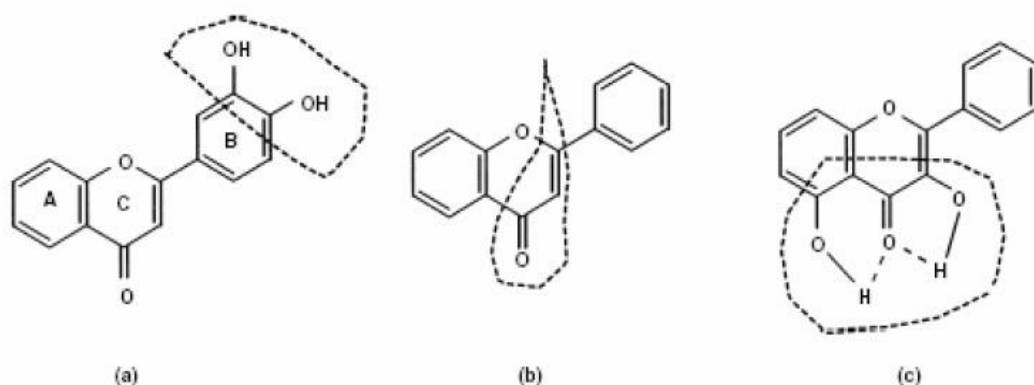
Neke od spomenutih metoda bit će detaljnije objašnjene u nastavku rada.

2.1.3. Veza između strukture i antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost flavonoida i njihovih metabolita ovisi o strukturnom rasporedu funkcionalnih grupa na glavnoj okosnici flavonoida (Šubarić i sur., 2010).

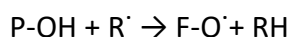
Postoje tri strukture flavonoida (**Slika 5**) sa sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala i/ili s antioksidativnim potencijalom:

- katehol jedinice na B prstenu (a),
- 2,3 dvostruka veza i 4-okso funkcija na C prstenu (b) i
- prisustvo hidroksilnih grupa na 3 i 5 poziciji (c).



Slika 5 Veza između antioksidativne aktivnosti i strukture flavonoida (Kopjar, 2007)

Na jačinu antioksidativne aktivnosti flavonoida ponajviše utječe prostorni raspored substituenata. Konfiguracija i broj hidroksilnih grupa utječu na mehanizam antioksidativne aktivnosti (Cao i sur., 1997; Haenen i sur., 1997; Sekher Pannala i sur., 2001; Burda i Oleszek, 2001). Kapacitet hvatanja slobodnih radikala se pripisuje visokoj reaktivnosti hidroksilnih grupa koje sudjeluju u slijedećoj reakciji (Šubarić i sur., 2010):



Hidroksilacija B prstena je najznačajnija u hvatanju reaktivnih čestica kisika i reaktivnih čestica dušika. Hidroksilne grupe B prstena doniraju vodik, a elektron stabilizira hidroksil, peroksil i peroksinitrit radikale i daje relativno stabilan radikal fenola. Između strukturnih homologa flavona i flavonona, hvatanje peroksil i hidroksil radikala, povećava se s ukupnim

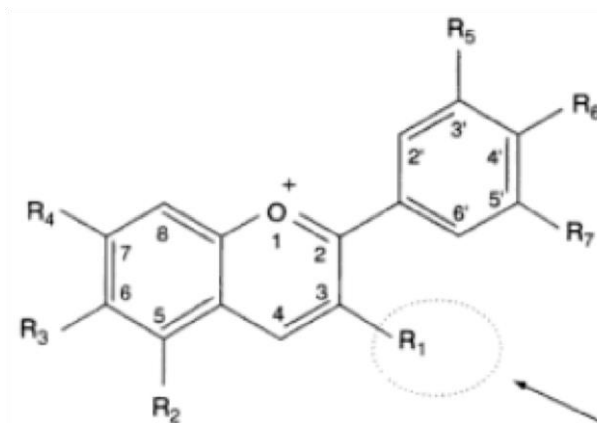
brojem OH grupa (Cao i sur., 1997). B prsten sa strukturom 3',4'-katehol pojačava inhibiciju oksidacije lipida. Takva struktura je najznačajnija odlika potencijalnih hvatača peroksil (Cao i sur., 1997; Dugas i sur., 2000), superoksid i peroksinitril radikala (Haenen i sur., 1997). Oksidacijom flavonoida na B prstenu katehola, nastaje stabilan osemikvinon radikal. Flavoni kojima nedostaje kateholna ili o-trihidroksil struktura tvore vrlo nestabilne radikale.

Heterociklički dio flavonoida doprinosi antioksidativnoj aktivnosti tako da osigurava prisutnost slobodnih OH grupa i omogućava konjugaciju između aromatskih prstenova (Šubarić i sur., 2010). Budući da su halkoni aktivni antioksidansi, zatvoreni C prsten nije neophodan za aktivnost flavonoida (Matthiesen i sur., 1997). Hvatanje slobodnih radikala pomoću flavonoida jako ovisi i o slobodnoj 3-OH grupi (Burda i Oleszek, 2001). S obzirom na to utvrđeno je da flavonoidi koji imaju slobodnu 3-OH grupu i 3',4'-katehol strukturu posjeduju 10 puta jaču sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Šubarić i sur., 2010).

2-3 dvostruke veze zajedno s 4-okso funkcijom su od velikog utjecaja na antioksidativnu aktivnost. Mnoga istraživanja ukazuju na to da su flavonoidi kojima nedostaju ova obilježja slabiji antioksidansi. Konjugacija A i B prstena omogućava rezonanciju aromatske jezgre što vodi ka nastajanju stabilnijeg radikala flavonoida (Bors i sur., 1990) i time optimizira efekat 3',4'-katehol strukture (Heim i sur., 2002).

Velik utjecaj na antioksidativnu aktivnost flavonoida ima i O-metiliranje, gdje se razlika u antioksidativnoj aktivnosti između polihidroksiliranih flavonoida i polimetoksiliranih flavonoida može pripisati njihovoj razlici u hidrofobnosti i planarnosti. Kvercetin je potencijalni hvatač peroksilradikala, a za njim slijede i O-glikozilirani derivati (Dugas i sur., 2000). Antioksidativna aktivnost 3',4'-katehol strukture je znatno kompromitirana dođe li do 4'-O-metilacije zbog steričkih promjena molekule (Heim i sur., 2002).

Budući da se flavonoidi pojavljuju u hrani obično kao o-glikozidi sa vezanim šećerom struktura tih šećera te položaj u kojem se nalazi pojedina skupina utječe na antioksidativnu aktivnost. Glikozidi su znatno slabiji antioksidansi nego aglikoni (Burda i Oleszek, 2001; Williamson i sur., 1999). Uobičajeno je da su glikozidne jedinice vezane na 3- ili 7- poziciji (**Slika 6**), ali vezivanje šećera na A prsten rezultira većim smanjenjem aktivnosti nego 3- glikozilacija. Glikozilacija, kao i O-metilacija, narušava planarnost B prstena u odnosu na ostatak molekule flavonoida i smanjuje sposobnost delokalizacije elektrona (Van Acker i sur., 1996; Bors i sur., 1990).



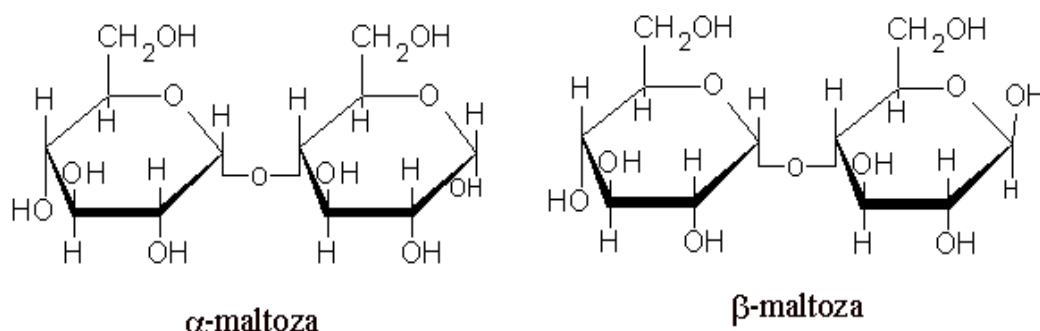
Slika 6 Najčešće mjesto vezanja šećerne jedinice (Heldman i sur., 2006)

Na antioksidativnu aktivnost također utječe stupanj polimerizacije. Dokazano je da su procijanidni dimeri i trimeri učinkovitiji nego monomeri kada su u pitanju superoksid aninoni (Vennat i sur., 1994). Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina ovisi o broju i položaju hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilnu funkcionalnu grupu (Rice-Evans i sur., 1996; Robards i sur., 1999).

2.2. ŠEĆERI

2.2.1. Maltoza

Maltoza (**Slika 7**) je disaharid koji nastaje hidrolizom molekula škroba pomoću enzima amilaze. Sastoji se od dvije jedinice glukoze povezane $\alpha(1\rightarrow4)$ -glikozidnom vezom. Prirodno je prisutna u žitaricama te je glavni sastojak isklijalog ječma koji se koristi kao temeljna sirovina u procesu vrenja piva (oslađivanje). U organizmu se pod utjecajem enzima maltaze razlaže na glukozu. Za industrijske potrebe koristi se prije svega u obliku sirupa za pripremu raznih dijetetskih preparata. Svojom slatkoćom, koja je blizu laktoze (oko 50% slatkoće saharoze), pokriva gorke i trpke frakcije hmelja u pivu. Naziva se još i sladni šećer.



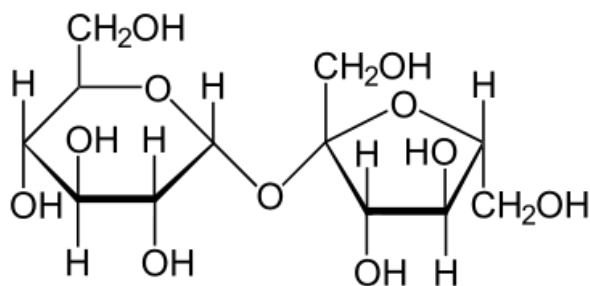
Slika 7 Stukturni prikaz molekula maltoze (Babić, 2007)

2.2.2. Saharoza

Saharoza je disaharid koji se uglavnom se proizvodi iz šećerne repe i šećerne trske te se naziva još i konzumni šećer. Kristalna saharoza je najvažnije sladilo u ljudskoj prehrani sa vrlo visokom energetsom vrijednosti, a uz masti je jedan od najjeftinijih izvora energije. Osim kao sladilo upotrebljava se i kao sredstvo za konzerviranje brojnih prehrambenih proizvoda bilo u prehrambenoj industriji ili u kućanstvima. U organizmu se potpuno i brzo resorbira (Pichler, 2011).

Saharoza je nereducirajući šećer, sastoji se od α -D-glukoze i β -D-fruktoze (**Slika 8**) povezanih glikozidnom vezom (Šubarić i sur., 2011). Kristal saharoze je vrlo složen i predstavlja kombinaciju šest kristalografskih oblika. Topljivost saharoze ovisi o temperaturi i udjelu stranih primjesa. Tali se pri temperaturama od 185 do 186 °C, a prisutnost nečistoća snižava točku taljenja saharoze. Topljiva je u vodi, a netopljiva u većini organskih otapala (Babić, 2007).

Djelovanjem kiselina, katalizatora ili enzima invertaze dolazi do razgradnje saharoze (hidroliza), odnosno kidaju se glikozidne veze čime se dobiva smjesa jednakih količina glukoze i fruktoze. Nastala smjesa naziva se invertni šećer zbog skretanja ravninu polarizirane svjetlosti u lijevo. Djelovanjem lužina dolazi do samo djelomične razgradnje saharoze a povišenjem pH vrijednosti i temperature razgradnja se povećava. S anorganskim solima i organskim spojevima saharoza daje spojeve koji su u vodi topljiviji od saharoze koji sprječavaju njenu kristalizaciju (Šubarić i sur., 2011).



Slika 8 Strukturni prikaz molekule saharoze (Babić, 2007)

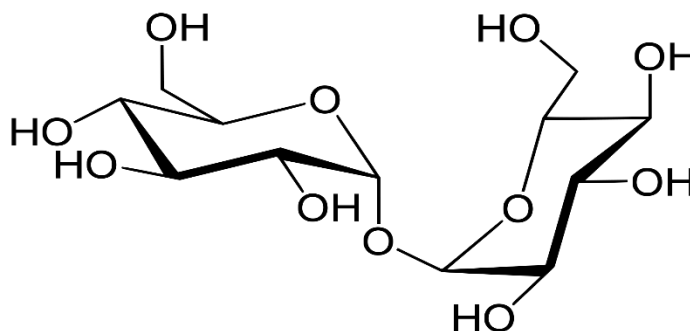
2.2.3. Trehaloza

Trehaloza (**Slika 9**) je disaharid koji se sastoji od dvije molekule D-glukoze povezane α -1,1 glikozidnom vezom (Choi i sur., 2006). Poznato je da je trehaloza jedan od glavnih izvora energije u mnogim živim organizmima: bakterijama, gljivama, insektima, biljkama i beskrležnjacima (Babić, 2007).

To je nereducirajući šećer koji se ne hidrolizira lako djelovanjem kiselina, te se glikozidna veza ne može cijepati pod utjecajem α -glukozidaze. Slatkoća joj je oko 45% slatkoće saharoze (Zhou i sur., 2006).

Kombinacija molekulske strukture i fizikalno-kemijskih svojstava rezultira vrlo stabilnim disaharidom (Kopjar, 2007). U usporedbi s drugim šećerima, trehaloza je stabilnija pri širokom rasponu pH vrijednosti i temperatura (Colacço i Roser, 1995). Moguće je pozitivno djelovanje trehaloze na svojstva prehrambenih i medicinskih proizvoda. Osim zaštitne uloge, trehaloza ima i druga pozitivna svojstva koja proizlaze iz prirode stabilne 1,1 veze. Jedno od tih svojstava je niska higroskopnost. Postoje tri mehanizma koja objašnjavaju zaštitno djelovanje trehaloze: zamjena uklonjene vode, staklasti prijelaz i kemijska stabilnost. Samo kombinacijom tih triju mehanizama može se postići stabilizirajući efekt trehaloze (Pinto i sur., 2006).

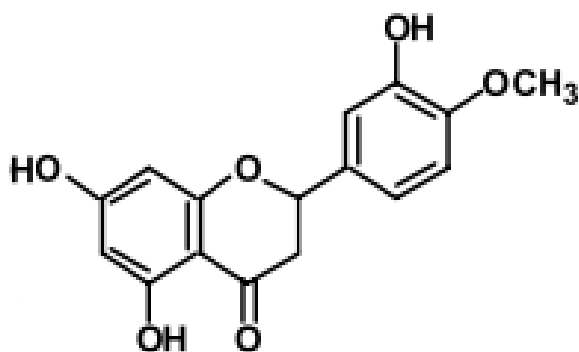
Primjenu pronalazi u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, u biotehnologiji za očuvanje bakterija i kvasaca te u prehrambenoj industriji (u proizvodnji pića, smrznute hrane i konditorskih proizvoda) (Patist i Zoerb, 2005; Pinto i sur., 2006; Leslie i sur., 1995; Van Dijak i sur., 1995).



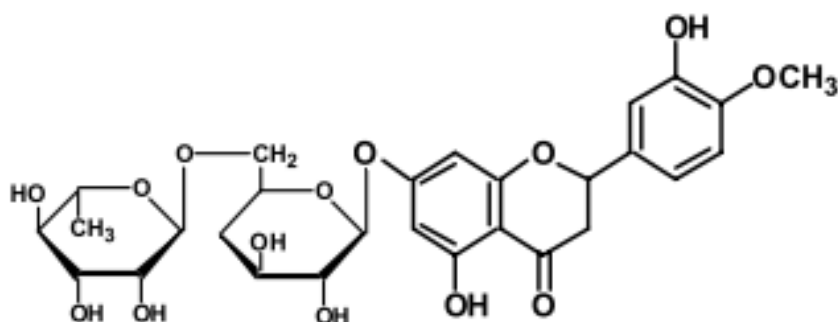
Slika 9 Strukturni prikaz molekule trehaloze (Babić, 2007)

2.4. GLUKOZIL HESPERIDIN

Jedni od najvažnijih sekundarnih metabolita biljaka su flavonoidi u koje spada i flavonon glikozid hesperidin. Izolirao ga je prvi puta Leberton 1827. godine iz kore citrusa. Njegov aglikonski dio naziva se hesperitin (**Slika 10**) koji je zajedno sa rutinozom povezan u hesperidin (**Slika 11**). Ovi flavonoidi mogu se pronaći u citrusnim voćkama poput limuna, naranče, grejpa, itd. Hesperidin i njegov aglikon hesperitin posjeduju mnoge pozitivne učinke. Mnoga istraživanja dokazala su njihovo antioksidativno, protuupalno, antikarcinogeno te antialergijsko djelovanje (Harborne i Williams, 2000). Također se nazivaju i bioflavonoidima upravo zbog svog širokog raspona učinka u živim stanicama. Smatra se da mogu inhibirati enzime kolagenazu i elastazu te time pridonjeti boljoj sintezi elastina i kolagena. Osim toga, poznati su po tome što pridonose jačanju stjenki krvnih žila pa se često mogu pronaći u preparatima protiv proširenih vena. Hesperidin i njegov aglikon hesperitin gotovo su netopljivi u vodi te je njihova topljivost manja od 0,01% (Yamada i sur., 2006). Upravo zbog teške topljivosti u vodi njegova je primjena bila ograničena pa je predložena metoda u kojoj bi se hesperidin preveo u oblik topljiv u vodi a to je glukozil hesperidin. Ovaj oblik hesperidina 10 000 puta je topljiviji u vodi, a što se tiče pozitivnih bioloških učinaka ne pokazuje odstupanje od hesperidina, već pokazuje i jače djelovanje (Saha i sur., 2009).



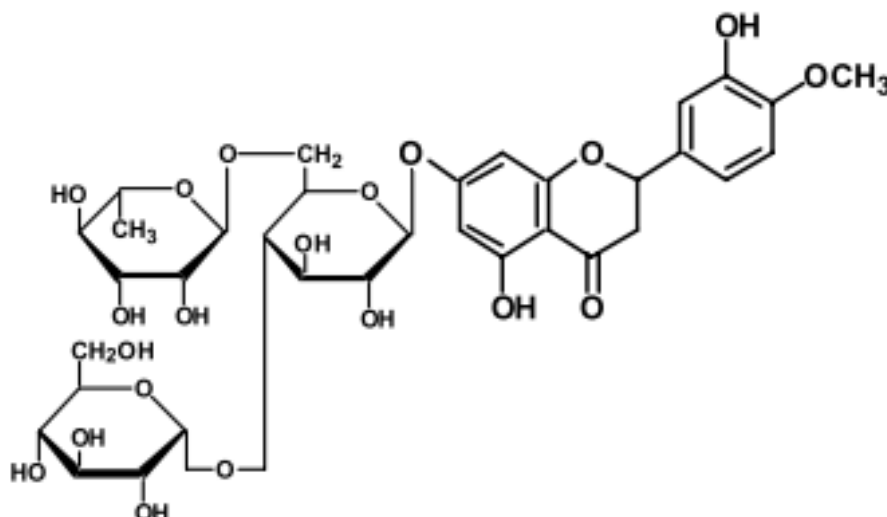
Slika 10 Hesperitin (Web 5)



Slika 11 Hesperidin (Web 6)

2.4.1. Proizvodnja glukozil hesperidina

Kao što je ranije navedeno zbog vrlo teške topljivosti u vodi ali i zbog lakše primjene hesperidina, skupina znanstvenika predložila je metodu kojom bi se netopljivi oblik preveo u vodi topljivi glukozil hesperidin (**Slika 12**). Za dobivanje glukozil hesperidina znanstvenici su primijenili biokemijski postupak transglikolizacije sa ciklodekstrin glukano-transferazom koja je dobivena iz bakterije *Bacillus stearothermophilus*. Kao rezultat nastaje α -glukozil hesperidin u kojem su D-glukozni ostatci vezani za hesperidin preko α veze. Do ove reakcije dolazi kada se enzim koji prenosi šećer nalazi u otopini zajedno s hesperidinom i s α -glukozil saharidom.



Slika 12 Glukozil hesperidin (Web 6)

Hijiya i sur. (1997) u svom istraživanju postupak su podijelili na nekoliko faza a to su: reakcija prijenosa saharida, pročišćavanje, hidroliza amilazom te na kraju karakterizacija dobivenog glukozil hesperidina.

Reakcija prijenosa saharida: Jedan maseni dio hesperidina i šest masenih dijelova dekstrina s DE 20, pomiješali su s 5 000 masenih dijelova vode te sve zajedno dobro pomiješali te smjesu stavili zagrijavati kako bi se otopila. U smjesu je još dodano 20 jedinica/g ciklomaltodekstrin glukanotransferaze dobivene iz bakterije *Bacillus stearothermophilus*. Smjesa je zatim stajala 18 sati prilikom čega su se održavali uvjeti: pH 6 a smjesa se zagrijavala na 70 °C sve do inaktivacije enzima. Dobivena tekućina sadrži α -glukozil hesperidin.

Pročišćavanje: Reakcijska smjesa dobivena prethodnim postupkom u ovoj se fazi filtrira a filtrat zatim nanosi na kolonu „HP-10“ koju čini sintetska makroporozna smola. Stupac kolone zatim se ispiri vodom a nakon toga nanosi se 50 v/v % vodenog etanola. Nakon toga eluat odlazi na koncentriranje pod vakuumom gdje se uklanja etanol a dobiva se blijedožuti praškasti α -glukozil hesperidin u prinosu od 130% prema težini početnog hesperidina (izraženo po suhoj tvari).

Hidroliza amilazom: Mali dio uzorka α -glukozil hesperidina iz prethodnog postupka otopljen je u vodi (1w/v %) te je u otopinu dodano 100 jedinica/g uzorka enzima glukoamilaze (EC 3.2.1.3). Smjesa je ostavljena da reagira pet sati te je tijekom tog vremena pH smjese

održavan na 5,0 a temperatura na 55 °C uz stalno zagrijavanje kako bi se preostali dio enzima inaktivirao. Smjesa zatim odlazi na filtraciju a dobiveni filtrat nanosi se na kolonu „HP-10“. Stupac kolone apsorbira α -glukozil hesperidin te hesperidin a glukoza i soli izlaze kroz kolonu van. Kolona se zatim ispiri vodom te vodenim etanolom kojemu se postepeno povećava koncentracija kako bi se dobila frakcija bogata α -glukozil hesperidinom. Slijedi koncentracija dobivene frakcije u vakuumu nakon čega nastaje blijedožuti praškasti α -glukozil hesperidin u prinosu od 70% u odnosu na težinu početnog hesperidina, računato na suhu tvar.

Drugi dio uzorka hidroliziran je na sličan način uz zamjenu glukoamilaze s β -amilazom (EC 3.2.1.2). Smjesa je također pročišćena te koncentrirana na način kao i prvi dio uzorka a dobiveni je blijedožuti praškasti glukozil hesperidin u prinosu od 70% u odnosu na težinu početnog hesperidina, računato na suhu tvar.

Karakterizacija glukozil hesperidina: otopina bogata α -glukozil hesperidinom koja je dobivena reakcijom prijenosa saharida i kontrolna otopina hesperidina koja je pripremljena na isti način osim što je enzim inaktiviran zagrijavanjem prije njegove upotrebe, ostavljeni su tijekom dva dana na 4 °C. Njihovom usporedbom nakon stajanja vidljivo je da otopina s α -glukozil hesperidinom prozirna dok se u otopini s hesperidinom pojavio bijeli talog. Iz navedenog se pokusa moglo zaključiti da je otopina dobivena reakcijom prijenosa saharida znatno topljivija u vodi tj. α -glukozil hesperidin topljiviji je u vodi od samog hesperidina.

2.4.2. Primjena glukozil hesperidina

Hesperidin poznat i kao žuti pigment od davnina se primjenjuje u prehrambenim proizvodima, lijekovima, kozmetici. Posjeduje mnoge fiziološke aktivnosti kao što je stabilizacija krvnih žila, prevencija krvarenja i regulacija krvnog tlaka. Utvrđeno je da može sudjelovati u nekim fiziološkim aktivnostima vitamina C *in vivo*. Kao primjeri se mogu navesti:

- hidroksilacija prolina i lizina koji su neophodni za sintezu kolagena koji je glavni element vezivnih tkiva,
- oksidacijsko-redukcijska reakcija citokroma C u kojoj je Fe^{3+} reduciran u Fe^{2+} , te
- sudjelovanje u imunološkom sustavu gdje pomaže stvaranju leukocita.

Danas se hesperidin koristi kao dodatak u različita pića i prehrambene proizvode zbog svoje boje ali i antioksidativnih svojstava. Može se koristiti sam ili u kombinaciji s različitim vitaminima i mineralima. U kozmetici nalazi primjenu kao UV-apsorber, sredstvo za čišćenje kože ili kao tvar koja inhibira pigment melanin odnosno kao sredstvo za izbjeljivanje kože (Hijiya i sur., 1997).

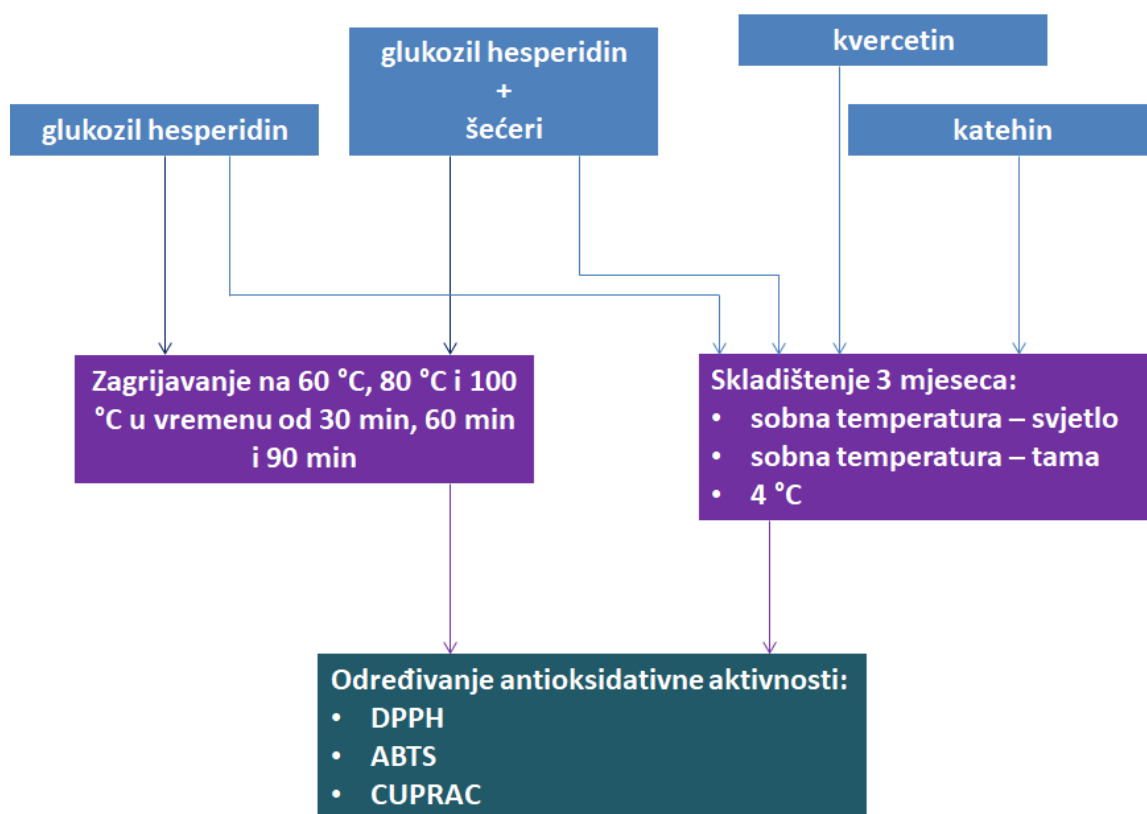
Budući da je glikozil hesperidin vrlo otporan na kiselinu i toplinu, a dobro se usklađuje s raznim sastojcima koji imaju kiseo, slan ili gorak okus može se koristiti u formulaciji različitih prehrambenih proizvoda i napitaka. Primjerice dodaje se začinima, slasticama u japanskom stilu, konditorskim proizvodima zapadnog stila, sladoledima, bezalkoholnim i alkoholnim pićima, kiselim konzerviranim proizvodima kao prirodni konzervans, konzerviranim mesnim proizvodima, mliječnim proizvodima i mnogim drugim. Također, glikozil hesperidin se može koristiti i kao dodatak u hranu za domaće životinje. Zbog blijedožute boje često se koristi i kao sredstvo za bojanje bez štetnih posljedica za proizvod. Primjenu nalazi kao antioksidans i stabilizator (Hijiya i sur., 1997).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je odrediti stabilnost i antioksidativnu aktivnost glukozil hesperidina kroz:

- određivanje antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina tijekom skladištenja 1 mjesec odnosno 3 mjeseca na sobnoj temperaturi, pri svjetlu i tami te pri 4 °C;
- određivanje utjecaja dodatka šećera (saharoze, trehaloze i maltoze) na antioksidativnu aktivnost glukozil hesperidina tijekom skladištenja 1 mjesec odnosno 3 mjeseca na sobnoj temperaturi, pri svjetlu i tami te pri 4 °C;
- određivanje termičke stabilnosti glukozil hesperidina (60, 80 i 100 °C) tijekom 30, 60 i 90 minuta;
- određivanje utjecaja dodatka šećera (saharoze, trehaloze i maltoze) i termičkog tretiranja (60, 80 i 100 °C) glukozil hesperidina tijekom 30, 60 i 90 minuta;
- usporedbu antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina tijekom skladištenja 1 mjesec odnosno 3 mjeseca na sobnoj temperaturi, pri svjetlu i tami te pri 4 °C s antioksidativnom aktivnosti katehina i kvercetina (**Slika 13**).



Slika 13 Shematski prikaz rada

3.2. MATERIJALI

Glukozil hesperidin, maltoza i trehaloza su dobiveni od Hayashibara kompanije, Nagase, Japan. Saharoza i kalij-peroksodisulfat kupljeni su od Kemike, Japan. Trolox, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), katehin te kvercetin, kupljeni su od Sigmee, Njemačka. Neokuproin i bakar-klorid su nabavljeni od Agros Organics iz Belgije, a amonij-acetat od Gram-mola iz Hrvatske.

3.2.1. PRIPREMA UZORAKA

Ispitivanje utjecaja skladištenja i usporedba s katehinom i kvercetinom

Pripremljene su 2 mM otopine glukozil hesperidina, katehina i kvercetina koje su se koristile za određivanje antioksidativne aktivnosti. Otopine su skladištene na sobnoj temperaturi na svjetlu i u mraku, te pri 4 °C. Uzorci za analizu uzeti su nakon mjesec dana skladištenja te nakon 3 mjeseca skladištenja.

Ispitivanje utjecaja dodatka šećera i skladištenja

Otopina glukozil hesperidina (2mM) pomiješana je s 10% šećera (saharoze, trehaloze i maltoze). Otopine su dobro homogenizirane te ostavljene 1 dan radi stabilizacije uzoraka. Tako pripremljene otopine koristile su se za određivanje antioksidativne aktivnosti. Otopine su skladištene na sobnoj temperaturi na svjetlu i u mraku, te pri 4 °C. Nakon mjesec dana skladištenja i nakon 3 mjeseca skladištenja uzeti su uzorci za analizu.

Ispitivanje utjecaja zagrijavanja i dodatka šećera

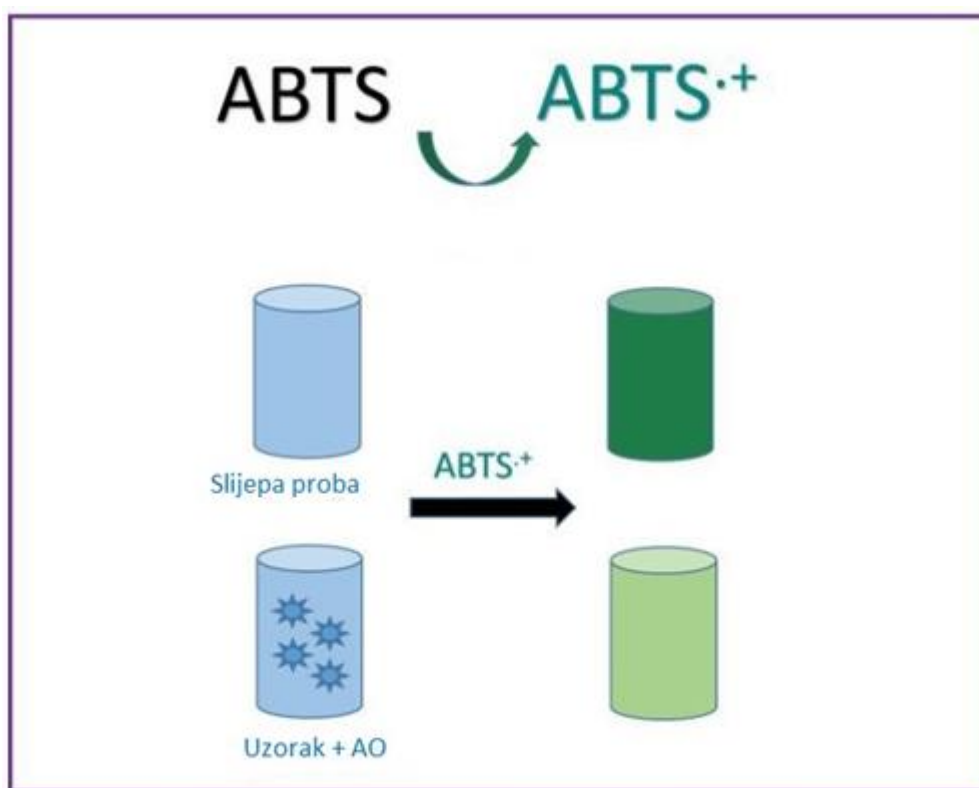
Homogenizirane otopine glukozil hesperidina (2mM) i 10% šećera (saharoze, trehaloze i maltoze) korištene su za određivanje termičke stabilnosti otopina. Dio otopine (10 mL) stavljen je u staklenu epruvetu s čepom. Tako pripremljeni uzorci stavljeni su u vodenu kupelj koja je prethodno bila zagrijana na 60 °C, 80 °C odnosno 100 °C. Uzorci su se termički tretirali 30 minuta, 60 minuta odnosno 90 minuta. Nakon odabranog vremena uzorci su ohlađeni te je provedena analiza antioksidativne aktivnosti.

3.3. METODE

3.3.1. Metode za određivanje antioksidativne stabilnosti

ABTS metoda

U ABTS metodi prati se raspadanje radikala $\text{ABTS}^{\cdot+}$ koji nastaje oksidacijom plavo-zelenog 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazilin-6-sulfonat) (ABTS) djelovanjem fenolnih tvari. U odsustvu fenolnih tvari, $\text{ABTS}^{\cdot+}$ je relativno stabilan, ali brzo reagira u prisustvu donora H^+ te prelazi u neobojeni oblik ABTS-a (**Slika 14**). Promjena boje detektira se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 734 nm.



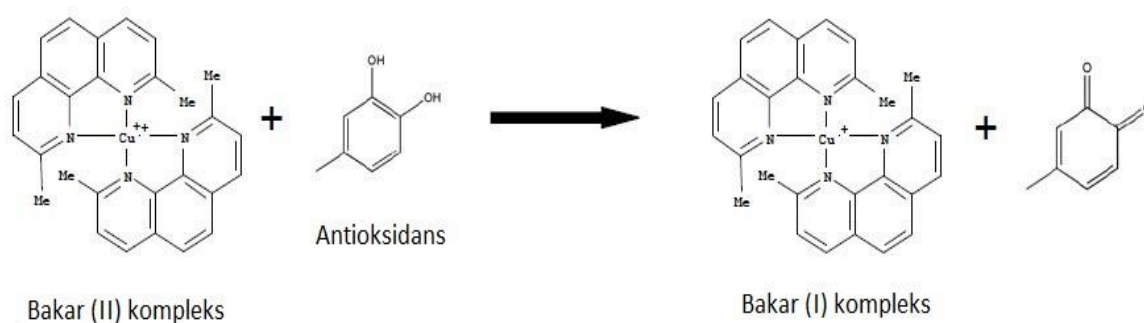
Slika 14 Mehanizam djelovanja ABTS metode (Web 2)

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS, dobro promiješa i smjesa se ostavi reagirati 1h i 35 min u mraku. Slijepa proba, umjesto uzorka sadrži istu količinu destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 734 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

3.3.2. Metode redukcije metalnih iona

CUPRAC test

Metode redukcije metalnih iona imaju za cilj procijeniti sposobnost uzorka da reducira željezne i bakrene ione u vodenom mediju, odnosno u slučaju CUPRAC metode određuje se sposobnost uzorka da reducira Cu (II)-neokuproin kompleks (CuII-Nc) (Apak i sur., 2004). Osnova metode je da kompleks neokuproina s reduciranim oblikom metala prikazuje karakteristične vidljive apsorpcijske vrpce s maksimalnim intenzitetom na 593 i 450 nm za CUPRAC test. Prema tome, sposobnost uzorka da reducira metalne komplekse, nakon određenog vremena inkubacije stvara odgovarajuće vidljive apsorpcijske vrpce koje se koriste za određivanje CUPRAC vrijednosti (Gungor i sur., 2011) (**Slika 16**).



Slika 16 Mehanizam djelovanja CUPRAC metode (Web 1)

Postupak: otpipetira se 1 mL otopine bakar klorida, 1 mL otopine neokuproina, 1 mL amonij acetata, 0,2 mL uzorka te 0,9 mL vode. Smjesa se homogenizira te ostavi stajati 30 minuta. Nakon inkubacije mjeri se absorbanca na 450 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje za trolox. Mjerenja su provedena u tri paralele.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kompleksnost matriksa hrane značajno utječe na kvalitetu proizvoda obzirom da kemijski sastav te uvjeti tijekom procesiranja i skladištenja utječu na interakcije unutar proizvoda. Provedena su brojna istraživanja na proizvodima i poluproizvodima od voća ali i modelnim sustavima kroz koja je dokazano da šećeri, tip šećera i koncentracija šećera te različiti načini pripreme uzoraka imaju značajan utjecaj na zadržavanje fenolnih komponenti i antioksidativnu aktivnost (Kopjar i sur., 2008, Kopjar i sur., 2009, Kopjar i sur., 2012, Lončarić i sur., 2016, Kopjar i sur., 2016, Betoret i sur., 2017). U ovom radu ispitivana je stabilnost i antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina pod različitim uvjetima.

4.1. UTJECAJ SKLADIŠTENJA I USPOREDBA S KATEHINOM I KVERCETINOM

Jedan od zadataka ovog rada bio je ispitati antioksidativnu aktivnost glukozil hesperidina, odrediti promjenu antioksidativne aktivnosti tijekom različitih uvjeta skladištenja. Također je cilj bio usporediti vrijednosti antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina s katehinom i kvercetinom (fenolnim komponentama koje se vrlo prisutne u biljnom tkivu) pod istim uvjetima.

Za određivanje antioksidativne aktivnosti korištene su tri metode: DPPH, ABTS i CUPRAC metoda, koje se međusobno razlikuju po mehanizmu reakcije.

Antioksidativna aktivnost, određena DPPH metodom, otopina glukozil hesperidina, katehina i kvercetina tijekom skladištenja prikazana je u **Tablici 2**. Antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina iznosila je 1,339 mg TE/mL. Katehin i kvercetin imali su značajno veće vrijednosti antioksidativne aktivnosti, oko 23 mg TE/mL.

Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti. Nakon mjesec dana skladištenja na sobnoj temperaturi uočeno je smanjenje antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina za 12%. Antioksidativna aktivnost katehina smanjila se za 21,4%, a najmanje smanjenje je utvrđeno kod kvercetina, 10,6%. U uzorcima koji su skladišteni pri sobnoj temperaturi u tami i pri 4 °C gubitak antioksidativne aktivnosti je bio manji. U uzorku glukozil hesperidina, u oba slučaja, gubitak antioksidativne aktivnosti je bio 6%. U uzorcima katehina i kvercetina skladištenim pri 4 °C gubitak antioksidativne aktivnosti bio je 6,2% odnosno 6,5%, neznatno više u odnosu na glukozil hesperidin. Tijekom skladištenja katehina i kvercetina pri sobnoj temperaturi u tami, smanjenje antioksidativne aktivnosti je bilo manje

nego kod uzoraka skladištenih na svjetlu, 13,4% i 8,2%. Za razliku od glukozil hesperidina koji pokazuje jednaku stabilnost pri 4 °C i pri sobnoj temperaturi (tama), katehin i kvercetin su stabilniji pri 4 °C.

Produljenjem skladištenja na 3 mjeseca došlo je do daljnjeg smanjenja antioksidativne aktivnosti. U uzorku glukozil hesperidina skladištenog na svjetlu gubitak antioksidativne aktivnosti je iznosio 16,4%, u tami 15,2% a pri 4 °C 12,2%. Kvercetin je imao manje smanjenje antioksidativne aktivnosti, 13,8%, 12,6% i 10%, za razliku od katehina kod kojeg su utvrđene vrlo velike promjena. Smanjenje antioksidativne aktivnosti kod katehina iznosilo je 61,3%, 59,2% i 42,8% za uzorke skladištene na svjetlu, u tami i pri 4°C.

Tablica 2 Antioksidativna aktivnost (mg TE/mL), određena DPPH metodom, otopina glukozil hesperidina, katehina i kvercetina tijekom skladištenja

	GH	K	Q
„0“	1,339±0,005	23,335±0,239	23,060±0,324
1 - st - S	1,178±0,018	18,339±0,282	20,606±0,365
1 - st - T	1,258±0,028	20,214±0,544	21,170±0,510
1 - 4 °C	1,257±0,041	21,886±0,076	21,571±0,401
3 - st - S	1,119±0,015	9,040±0,037	19,885±0,453
3 - st - T	1,136±0,035	9,527±0,355	20,159±0,659
3 - 4 °C	1,176±0,019	13,338±0,528	20,754±0,103

GH: glukozil hesperidin; K: katehin; Q: kvercetin; „0“: uzorak nakon pripreme; 1 - st - S: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 1 - st - T: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi u tami; 1 - 4 °C: uzorak skladišten 1 mjesec pri 4 °C; 3 - st - S: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 3 - st - T: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi u tami; 3 - 4 °C: uzorak skladišten 3 mjeseca pri 4 °C.

Antioksidativna aktivnost određena ABTS metodom, otopina glukozil-hesperidina, katehina i kvercetina tijekom skladištenja prikazana je u **Tablici 3**. Antioksidativna aktivnost glukozil-hesperidina iznosila je 2,750 mg TE/mL. Katehin i kvercetin imali su značajno veće vrijednosti antioksidativne aktivnosti, 44,092 mg TE/mL i 45,761 mg TE/mL.

Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti. Nakon mjesec dana skladištenja na sobnoj temperaturi, antioksidativna aktivnost katehina se je smanjila za čak 88%, kvercetina za 44,5%, a najmanje smanjenje je utvrđeno kod glukozil hesperidina, 12,3%. U uzorcima koji su skladišteni pri sobnoj temperaturi u tami i pri 4 °C gubitak

antioksidativne aktivnosti je bio manji, a najmanji je bio u uzorcima glukozil hesperidina, 10,8% i 6,9%. U uzorcima katehina i kvercetina skladištenim u tami i pri 4 °C gubitak antioksidativne aktivnosti bio je vrlo sličan, 84,5% i 45,1%.

Produljenjem skladištenja na 3 mjeseca došlo je do daljnjeg smanjenja antioksidativne aktivnosti. U uzorku glukozil hesperidina skladištenog na svjetlu gubitak antioksidativne aktivnosti se znatno povećao i iznosio je 40,7%, u tami 33,1% a pri 4 °C 25,3%. Kvercetin i katehin su imali veće smanjenje antioksidativne aktivnosti u odnosu na glukozil hesperidin tijekom skladištenja. Smanjenje antioksidativne aktivnosti kod katehina iznosilo je 94,1%, 95,2% i 91,3%, za uzorke skladištene na svjetlu, u tami i pri 4°C. Za uzorke kvercetina smanjenje je bilo niže za 71,9%, 58,8% i 56,6%, za uzorke skladištene na svjetlu, u tami i pri 4°C.

Tablica 3 Antioksidativna aktivnost (mg TE/mL), određena ABTS metodom, otopina glukozil hesperidina, katehina i kvercetina tijekom skladištenja

	GH	K	Q
„0“	2,750±0,028	44,092±0,384	45,761±0,774
1 - st - S	2,411±0,046	5,278±0,495	25,380±0,322
1 - st - T	2,453±0,088	6,638±0,501	25,067±0,549
1 - 4 °C	2,561±0,022	6,780±0,070	25,140±0,596
3 - st - S	1,631±0,072	2,599±0,026	12,868±0,162
3 - st - T	1,839±0,025	3,299±0,015	18,841±0,121
3 - 4 °C	2,053±0,015	3,841±0,140	19,883±0,206

GH: glukozil hesperidin; K: katehin; Q: kvercetin; „0“: uzorak nakon pripreme; 1 - st – S: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 1 - st - T: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi u tami; 1 - 4 °C: uzorak skladišten 1 mjesec pri 4 °C; 3 - st – S: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 3 - st - T: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi u tami; 3 - 4 °C: uzorak skladišten 3 mjeseca pri 4 °C.

Antioksidativna aktivnost, određena CUPRAC metodom, otopina glukozil hesperidina, katehina i kvercetina tijekom skladištenja prikazana je u **Tablici 4**. U usporedbi s DPPH i ABTS metodama, ovom metodom su dobivene puno niže vrijednosti, odnosno više vrijednosti.

Antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina iznosila je 328,58 µg TE/mL. Katehin i kvercetin imali su značajno veće vrijednosti antioksidativne aktivnosti, 3061,56 µg TE/mL i

1371,33 $\mu\text{g TE/mL}$. U slučaju određivanja antioksidativne aktivnosti CUPRAC metodom za razliku od DPPH i ABTS metoda uočena je i velika razlika između vrijednosti antioksidativne aktivnosti katehina i kvercetina, odnosno katehin je imao značajno veću antioksidativnu aktivnost od kvercetina.

Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti. Nakon mjesec dana skladištenja smanjenje antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina bilo je 13%, 12,7% i 12,3% na sobnoj temperaturi na svjetlu i u tami te pri 4 °C. Glukozil hesperidin i u ovom slučaju pokazuje značajnu stabilnost u odnosu na katehin i kvercetin. Antioksidativna aktivnost katehina se je smanjila za čak 70,8%, 64% i 64% za uzorke skladištene na sobnoj temperaturi na svjetlu i u tami te pri 4 °C. smanjenje antioksidativne aktivnosti kvercetina je manje u odnosu na katehin, 22%, 14,7% i 11,8 za uzorke skladištene na sobnoj temperaturi na svjetlu i u tami te pri 4 °C.

Tablica 4 Antioksidativna aktivnost ($\mu\text{g TE/mL}$), određena CUPRAC metodom, otopina glukozil hesperidina, katehina i kvercetina tijekom skladištenja

	GH	K	Q
„0“	328,58 \pm 2,40	3061,56 \pm 2,32	1371,33 \pm 2,41
1 - st - S	285,72 \pm 2,28	894,89 \pm 2,43	1069,48 \pm 3,69
1 - st - T	286,83 \pm 6,34	1100,74 \pm 2,25	1169,48 \pm 3,96
1 - 4 °C	288,04 \pm 2,27	1101,93 \pm 2,58	1210,07 \pm 3,02
3 - st - S	156,19 \pm 2,63	361,69 \pm 1,12	418,72 \pm 2,54
3 - st - T	158,72 \pm 1,49	469,33 \pm 2,12	486,33 \pm 2,74
3 - 4 °C	168,31 \pm 1,11	482,39 \pm 2,45	582,83 \pm 2,41

GH: glukozil hesperidin; K: katehin; Q: kvercetin; „0“: uzorak nakon pripreme; 1 - st – S: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 1 - st - T: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi u tami; 1 - 4 °C: uzorak skladišten 1 mjesec pri 4 °C; 3 - st – S: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 3 - st - T: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi u tami; 3 - 4 °C: uzorak skladišten 3 mjeseca pri 4 °C.

Produljenjem skladištenja na 3 mjeseca došlo je do daljnjeg smanjenja antioksidativne aktivnosti s time da je najmanje smanjenje utvrđeno kod glukozil hesperidina. U uzorku glukozil hesperidina skladištenog na svjetlu gubitak antioksidativne aktivnosti se je znatno povećao i iznosio je 52,5%, u tami 51,7% a pri 4 °C 48,4%. Kvercetin i katehin su imali veće

smanjenje antioksidativne aktivnosti u odnosu na glukozil hesperidin tijekom skladištenja. Smanjenje antioksidativne aktivnosti kod katehina iznosilo je 88,2%, 84,7% i 84,2%, za uzorke skladištene na svjetlu, u tami i pri 4 °C. Za uzorke kvercetina smanjenje je bilo niže za 69,5%, 64,5% i 57,5%, za uzorke skladištene na svjetlu, u tami i pri 4 °C.

4.2. UTJECAJ DODATKA ŠEĆERA I SKLADIŠTENJA

Zadatak ovog rada bio je i ispitati antioksidativnu aktivnost glukozil-hesperidina uz dodatak šećera (saharoze, trehaloze i maltoze), odrediti promjenu antioksidativne aktivnosti tijekom različitih uvjeta skladištenja.

Antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom, otopina glukozil hesperidina uz dodatak šećera tijekom skladištenja prikazana je u **Tablici 5**. Antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina iznosila je 1,339 mg TE/mL. U uzorcima s dodatkom saharoze i trehaloze određene su neznatno veće vrijednosti antioksidativne aktivnosti, 1,424 i 1,401 mg TE/mL, a u uzorku s dodatkom maltoze neznatno manja vrijednost 1,304 mg TE/mL.

Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti. Nakon mjesec dana skladištenja antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina se je smanjila za 12% pri sobnoj temperaturi na svjetlu, i za 6% za uzorke skladištene u tami i pri 4 °C. Kod uzoraka s dodatkom šećera uočen je drugačiji trend. U uzorcima s dodatkom saharoze i trehaloze (skladištenim pri sobnoj temperaturi na svjetlu) određeno je veće smanjenje antioksidativne aktivnosti, 13,8% i 16,8%, a u uzorku s dodatkom maltoze manja 11,2% u usporedbi s uzorkom bez dodatka šećera. U uzorcima s dodatkom, maltoze i trehaloze (skladištenim pri sobnoj temperaturi u mraku) određeno je veće smanjenje antioksidativne aktivnosti, 13,6%, 8,1% i 11,4%, u usporedbi s uzorkom bez dodatka šećera. U uzorcima skladištenim pri 4 °C, za razliku od svih ostalih uzoraka, u uzorku s dodatkom maltoze nije došlo da promjene antioksidativne aktivnosti. Pri ovim uvjetima najveće samnjenje antioksidativne aktivnosti utvrđeno je u uzorku s dodatkom trehaloze, 10,8%.

Produljenjem skladištenja na 3 mjeseca došlo je do daljnjeg smanjenja antioksidativne aktivnosti. U uzorku glukozil hesperidina skladištenog na svjetlu gubitak antioksidativne aktivnosti je iznosio 16,4%, u tami 15,2% a pri 4 °C 12,2%. U svim uzorcima s dodatkom šećera

pri svim uvjetima skladištenja određeno je veće smanjenje antioksidativne aktivnosti nego u uzorcima bez dodatka šećera. U uzorcima skladištenim pri sobnoj temperaturi na svjetlu smanjenje je iznosilo od 22,3% do 25,4%. Skladištenjem u tami smanjenje antioksidativne aktivnosti bilo je od 18,8% do 23,5%, a pri 4 °C od 14,4% do 20,6%.

Tablica 5 Antioksidativna aktivnost (mg TE/mL), određena DPPH metodom, otopina glukozil hesperidina i glukozil hesperidina/šećera tijekom skladištenja

	GH	GH+S	GH+M	GH+T
„0“	1,339±0,005	1,424±0,027	1,304±0,016	1,401±0,047
1 - st - S	1,178±0,018	1,227±0,013	1,158±0,018	1,166±0,039
1 - st - T	1,258±0,028	1,230±0,007	1,198±0,015	1,241±0,009
1 - 4 °C	1,257±0,041	1,340±0,013	1,308±0,066	1,249±0,014
3 - st - S	1,119±0,015	1,083±0,019	0,973±0,014	1,088±0,010
3 - st - T	1,136±0,035	1,089±0,038	1,059±0,046	1,113±0,018
3 - 4 °C	1,176±0,019	1,185±0,044	1,116±0,015	1,113±0,016

GH: glukozil hesperidin; S: saharoza; M: maltoza; T: trehaloza; „0“: uzorak nakon pripreme; 1 - st – S: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 1 - st - T: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi u tami; 1 - 4 °C: uzorak skladišten 1 mjesec pri 4 °C; 3 - st – S: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 3 - st - T: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi u tami; 3 - 4 °C: uzorak skladišten 3 mjeseca pri 4 °C.

Antioksidativna aktivnost, određena ABTS metodom, otopina glukozil hesperidina uz dodatak šećera tijekom skladištenja prikazana je u **Tablici 6**. Antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina iznosila je 2,750 mg TE/mL. Antioksidativna aktivnost uzoraka s dodatkom šećera iznosila je 2,55 mg TE/mL, bez obzira na tip šećera.

Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti. Nakon mjesec dana skladištenja antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina se je smanjila za 12,3%, 10,8% i 6,9% pri sobnoj temperaturi na svjetlu, u tami i pri 4 °C. U uzorcima s dodatkom šećera skladištenim pri sobnoj temperaturi na svjetlu smanjenje je iznosilo od 13% do 15,4%, s time da je u uzorku s dodatkom trehaloze određeno najveće smanjenje a u uzorku s dodatkom maltoze najmanje smanjenje antioksidativne aktivnosti. Prilikom skladištenja u tami, utvrđeno je da je u uzorku s dodatkom saharoze smanjenje antioksidativne aktivnosti iznosilo samo 6,8%

odnosno manje nego u uzorku bez dodatka šećera. U druga dva uzorka smanjenje je bilo veće (14,5% i 11,8%, za maltozu i trehalozu) u usporedbi s uzorkom bez dodatka šećera. Skladištenjem pri 4 °C, u uzorcima s dodatkom trehaloze utvrđeno je najmanje smanjenje antioksidativne aktivnosti, samo 4,4%, a u uzorku s dodatkom maltoze najveće, 8,1%.

Produljenjem skladištenja na 3 mjeseca došlo je do daljnjeg smanjenja antioksidativne aktivnosti. U uzorku glukozil hesperidina skladištenog na svjetlu gubitak antioksidativne aktivnosti je iznosio 40,7%, u tami 33,1% a pri 4 °C 25,3%. U ovom slučaju, u svim uzorcima s dodatkom šećera pri svim uvjetima skladištenja određeno je manje smanjenje antioksidativne aktivnosti. U uzorcima skladištenim pri sobnoj temperaturi na svjetlu smanjenje je iznosilo od 27% do 29%. Skladištenjem u tami smanjenje antioksidativne aktivnosti bilo je od 25,1% do 26,3%, a pri 4 °C od 22,7% do 28,1%.

Tablica 6 Antioksidativna aktivnost (mg TE/mL), određena ABTS metodom, otopina glukozil hesperidina i glukozil hesperidina/šećera tijekom skladištenja

	GH	GH+S	GH+M	GH+T
„0“	2,750±0,028	2,531±0,001	2,578±0,031	2,572±0,025
1 - st - S	2,411±0,046	2,185±0,043	2,243±0,045	2,176±0,014
1 - st - T	2,453±0,088	2,359±0,072	2,205±0,022	2,269±0,049
1 - 4 °C	2,561±0,022	2,359±0,063	2,368±0,059	2,459±0,060
3 - st - S	1,631±0,072	1,815±0,077	1,883±0,065	1,827±0,001
3 - st - T	1,839±0,025	1,895±0,012	1,899±0,015	1,897±0,010
3 - 4 °C	2,053±0,015	1,956±0,031	1,854±0,080	1,949±0,044

GH: glukozil hesperidin; S: saharoza; M: maltoza; T: trehaloza; „0“: uzorak nakon pripreme; 1 - st – S: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 1 - st - T: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi u tami; 1 - 4 °C: uzorak skladišten 1 mjesec pri 4 °C; 3 - st – S: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 3 - st - T: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi u tami; 3 - 4 °C: uzorak skladišten 3 mjeseca pri 4 °C.

Antioksidativna aktivnost određena CUPRAC metodom, otopina glukozil hesperidina, katehina i kvercetina tijekom skladištenja prikazana je u **Tablici 7**. Antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina iznosila je 328,58 µg TE/mL. Antioksidativna aktivnost uzoraka s dodatkom šećera iznosila je 332 µg TE/mL, bez obzira na tip šećera.

Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti. Nakon mjesec dana skladištenja antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina se je smanjila za 13%, 12,7% i 12,3% pri sobnoj temperaturi na svjetlu, u tami i pri 4 °C. U uzorcima s dodatkom šećera skladištenim pri sobnoj temperaturi na svjetlu smanjenje je iznosilo od 19,7% do 22,5%, s time da je u uzorku s dodatkom trehaloze određeno najveće smanjenje antioksidativne aktivnosti. Prilikom skladištenja u tami, smanjenje antioksidativne aktivnosti iznosilo je od 17,1% do 20,8% najveće smanjenje u uzorku s dodatkom trehaloze. Pri 4 °C, smanjenje antioksidativne aktivnosti iznosila je od 11,6% do 16%, s time da je u ovom slučaju uzorak s dodatkom maltoze imao najveće smanjenje ispitivanog parametra.

Produljenjem skladištenja na 3 mjeseca došlo je do daljnjeg smanjenja antioksidativne aktivnosti. U uzorku glukozil hesperidina skladištenog na svjetlu gubitak antioksidativne aktivnosti je iznosio 52,5%, u tami 51,7% a pri 4 °C 48,8%. U uzorcima s dodatkom šećera skladištenim pri sobnoj temperaturi na svjetlu smanjenje je iznosilo od 55,8% do 56,7%. Prilikom skladištenja u tami, smanjenje antioksidativne aktivnosti iznosilo je od 50,8% do 56,4%, s time da je uzorak s dodatkom trehaloze imao najmanje smanjenje antioksidativne aktivnosti. Pri 4 °C, smanjenje antioksidativne aktivnosti iznosila je od 49,4% do 56% te je također uzorak s dodatkom trehaloze imao najmanje smanjenje antioksidativne aktivnosti.

Tablica 7 Antioksidativna aktivnost ($\mu\text{g TE/mL}$), određena CUPRAC metodom, otopina glukozil hesperidina i glukozil hesperidina/šećera tijekom skladištenja

	GH	GH+S	GH+M	GH+T
„0“	328,58 \pm 2,40	331,94 \pm 2,04	332,65 \pm 2,74	331,52 \pm 1,87
1 - st - S	285,72 \pm 2,28	263,11 \pm 2,48	267,11 \pm 3,00	256,83 \pm 2,44
1 - st - T	286,83 \pm 6,34	275,20 \pm 1,66	269,20 \pm 3,87	262,41 \pm 2,44
1 - 4 °C	288,04 \pm 2,27	285,91 \pm 3,80	279,26 \pm 1,55	293,19 \pm 3,78
3 - st - S	156,19 \pm 2,63	144,30 \pm 1,28	147,13 \pm 4,60	143,44 \pm 3,00
3 - st - T	158,72 \pm 1,49	144,78 \pm 3,90	147,54 \pm 3,97	163,06 \pm 2,08
3 - 4 °C	168,31 \pm 1,11	145,91 \pm 3,46	159,46 \pm 2,32	167,65 \pm 3,68

GH: glukozil hesperidin; S: saharoza; M: maltoza; T: trehaloza; „0“: uzorak nakon pripreme; 1 - st – S: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 1 - st - T: uzorak skladišten 1 mjesec na sobnoj temperaturi u tami; 1 - 4 °C: uzorak skladišten 1 mjesec pri 4 °C; 3 - st – S: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi pri svjetlu; 3 - st - T: uzorak skladišten 3 mjeseca na sobnoj temperaturi u tami; 3 - 4 °C: uzorak skladišten 3 mjeseca pri 4 °C.

4.3. UTJECAJ ZAGRIJAVANJA I DODATKA ŠEĆERA

Ispitivan je i utjecaj zagrijavanja (60 °C, 80 °C i 100 °C), vremena zagrijavanja (30 min, 60 min i 90 min) i dodatka šećera (saharoze, maltoze i trehaloze) tijekom zagrijavanja na antioksidativnu aktivnost otopina glukozil hesperidina. Vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobivene nakon zagrijavanja pri određenoj temperaturi određeno vrijeme, uspoređene su s nultim uzorcima („0“) koji su prikazani u **Tablicama 5-7**.

Rezultati antioksidativne aktivnosti, određene DPPH metodom otopina, glukozil hesperidina i glukozil hesperidina/šećera koje su zagrijavane pri 60 °C, 80 °C i 100 °C tijekom 30 min, 60 min i 90 min su prikazani u **Tablici 8**.

Pri 60 °C došlo je do vrlo malog smanjenja antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina od 3,2% do 4,6%. Najveće smanjenje je utvrđeno nakon 90 min zagrijavanja. U uzorcima s dodatkom šećera, najmanje smanjenje antioksidativne aktivnosti određeno je u uzorku s dodatkom maltoze (3,5%, 6,5% i 7,1% za 30 min, 60 min i 90 min), a najveće u uzorku s dodatkom saharoze (13,8%, 14,7% i 15,7% za 30 min, 60 min i 90 min).

Pri 80 °C smanjenje antioksidativne aktivnosti glukozilhesperidina se je povećalo te je iznosilo od 12% do 15,8%. U uzorcima s dodatkom šećera antioksidativna aktivnost se je smanjila za 20,3% do 23,8%, te nisu uočene velike razlike između tipa šećera.

Pri 100 °C, antioksidativna aktivnosti glukozil hesperidina se je smanjila za 15,8%, 24,4% i 28,2% (za 30 min, 60 min i 90 min). U uzorcima s dodatkom šećera utvrđeno je veće smanjenje antioksidativne aktivnosti u odnosu na uzorke bez dodatka šećera. U uzorku s dodatkom saharoze produženjem vremena zagrijavanja povećalo se je smanjenje antioksidativne aktivnosti, 22,1%, 25,3% i 31,2%. U uzorcima s dodatkom maltoze i trehaloze nakon 30 minuta smanjenje je iznosilo 21,6% i 23,8%, a nakon 60 odnosno 90 minuta smanjenje je iznosilo 32,3% i oko 28,5%.

Tablica 8 Antioksidativna aktivnost (mg TE/mL), određena DPPH metodom, termički tretiranih (60 °C, 80 °C i 100 °C) otopina glukozil hesperidina i glukozil hesperidina/šećera tijekom zagrijavanja od 30 min, 60 min i 90 min

Uzorci	30 min	60 min	90 min
60 °C			
GH	1,296±0,010	1,291±0,023	1,277±0,014
GH+S	1,228±0,006	1,215±0,031	1,201±0,029
GH+M	1,259±0,010	1,219±0,019	1,212±0,050
GH+T	1,256±0,018	1,255±0,006	1,225±0,015
80 °C			
GH	1,178±0,016	1,129±0,031	1,127±0,020
GH+S	1,130±0,013	1,110±0,004	1,097±0,014
GH+M	1,022±0,036	1,015±0,009	0,997±0,006
GH+T	1,106±0,007	1,089±0,008	1,068±0,041
100 °C			
GH	1,127±0,020	1,012±0,035	0,962±0,011
GH+S	1,110±0,004	1,064±0,092	0,980±0,043
GH+M	1,022±0,036	0,881±0,066	0,883±0,040
GH+T	1,068±0,041	1,006±0,019	0,994±0,004

GH: glukozil hesperidin; S: saharoza; M: maltoza; T: trehaloza

Rezultati antioksidativne aktivnosti određene ABTS metodom otopina, glukozil hesperidina i glukozil hesperidina/šećera koje su zagrijavane pri 60 °C, 80 °C i 100 °C tijekom 30 min, 60 min i 90 min su prikazani u **Tablici 9**. Rezultati antioksidativne aktivnosti određene ABTS metodom pokazuju drugačiji trend u odnosu na DPPH metodu.

Pri 60 °C došlo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina za 12,7%, 17% i 22,4% (za 30 min, 60 min i 90 min). U uzorcima s dodatkom šećera utvrđeno je manje smanjenje antioksidativne aktivnosti u usporedbi s uzorkom bez dodatka šećera. Najmanje smanjenje antioksidativne aktivnosti određeno je u uzorku s dodatkom trehaloze (2,8%, 3,9% i 8% za 30 min, 60 min i 90 min), a najveće u uzorku s dodatkom maltoze (15,1% i 17% za 60 min i 90 min).

Pri 80 °C smanjenje antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina se je povećalo te je iznosilo od 27% do 28,8%. U uzorcima s dodatkom maltoze antioksidativna aktivnost se je najviše smanjila (17,8%, 19,6% i 25,2% za 30 min, 60 min i 90 min), dok između uzoraka s dodatkom saharoze i trehaloze nisu uočene značajnije razlike.

Pri 100 °C, utvrđeno je smanjenje antioksidativne aktivnosti s produženjem vremena zagrijavanja kod svih uzoraka; ovo je trend koji do sada nije bio uočen u našim uzorcima. Antioksidativna aktivnosti glukozil hesperidina se je smanjila za 25,1%, 24,7% i 20,7% (za 30 min, 60 min i 90 min). U uzorcima s dodatkom šećera utvrđeno je manje smanjenje antioksidativne aktivnosti u odnosu na uzorke bez dodatka šećera. U uzorcima s dodatkom šećera smanjenje antioksidativne aktivnosti iznosilo je oko 16%, oko 14% i oko 10% (za 30 min, 60 min i 90 min).

Tablica 9 Antioksidativna aktivnost (mg TE/mL), određena ABTS metodom, termički tretiranih (60 °C, 80 °C i 100 °C) otopina glukozil hesperidina i glukozil hesperidina/šećera tijekom zagrijavanja od 30 min, 60 min i 90 min

Uzorci	30 min	60 min	90 min
60 °C			
GH	2,401±0,042	2,282±0,074	2,135±0,082
GH+S	2,327±0,021	2,212±0,022	2,112±0,072
GH+M	2,395±0,086	2,189±0,027	2,141±0,045
GH+T	2,501±0,091	2,472±0,030	2,365±0,070
80 °C			
GH	2,001±0,062	1,962±0,067	1,959±0,009
GH+S	2,174±0,028	2,097±0,127	2,039±0,054
GH+M	2,119±0,064	2,073±0,073	1,928±0,001
GH+T	2,180±0,048	2,147±0,062	2,050±0,017
100 °C			
GH	2,059±0,040	2,072±0,033	2,181±0,065
GH+S	2,104±0,069	2,163±0,022	2,282±0,098
GH+M	2,119±0,055	2,209±0,096	2,270±0,056
GH+T	2,167±0,011	2,253±0,093	2,260±0,017

GH: glukozil hesperidin; S: saharoza; M: maltoza; T: trehaloza

Rezultati antioksidativne aktivnosti određene CUPRAC metodom, otopina glukozil hesperidina i glukozil hesperidina/šećera koje su zagrijavane pri 60 °C, 80 °C i 100 °C tijekom 30 min, 60 min i 90 min su prikazani u **Tablici 10**. Rezultati antioksidativne aktivnosti određene CUPRAC metodom pokazuju isti trend kao i DPPH metoda odnosno rastući trend smanjenja antioksidativne aktivnosti s produženjem vremena zagrijavanja. U slučaju ove metode nisu

utvrđene tako velike razlike između uzoraka s dodatkom šećera u usporedbi s uzorkom s dodatkom šećera.

Pri 60 °C došlo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina za 16,7%, 24,7% i 27% (za 30 min, 60 min i 90 min). U uzorcima s dodatkom maltoze utvrđeno je najveće smanjenje antioksidativne aktivnosti u usporedbi s uzorkom bez dodatka šećera (11,1%, 26,5% i 30% za 30 min, 60 min i 90 min).

Pri 80 °C smanjenje antioksidativne aktivnosti glukozil hesperidina se je povećalo te je iznosilo 19,3%, 22,7% i 25,7%. U uzorcima s dodatkom trehaloze antioksidativna aktivnost se je najmanje smanjila (13,5%, 16,5% i 24,5% za 30 min, 60 min i 90 min).

Pri 100 °C, antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina se je smanjila za 17%, 20,1% i 38,7% (za 30 min, 60 min i 90 min). U uzorku s dodatkom trehaloze utvrđeno je najmanje smanjenje antioksidativne aktivnosti u odnosu na uzorke bez dodatka šećera (13,8%, 15,2% i 36,2% za 30 min, 60 min i 90 min).

Tablica 10 Antioksidativna aktivnost ($\mu\text{g TE/mL}$) određena CUPRAC metodom, termički tretiranih (60 °C, 80 °C i 100 °C) otopina glukozil hesperidina i glukozil hesperidina/šećera tijekom zagrijavanja od 30 min, 60 min i 90 min

Uzorci	30 min	60 min	90 min
60 °C			
GH	273,57 \pm 5,40	247,47 \pm 4,02	239,76 \pm 5,04
GH+S	306,94 \pm 2,24	255,96 \pm 1,71	238,90 \pm 7,44
GH+M	295,82 \pm 5,07	244,51 \pm 4,69	232,73 \pm 6,47
GH+T	297,53 \pm 2,35	260,41 \pm 2,71	254,01 \pm 2,14
80 °C			
GH	265,17 \pm 4,16	254,03 \pm 3,40	244,25 \pm 2,74
GH+S	267,51 \pm 2,06	247,12 \pm 3,54	244,02 \pm 7,86
GH+M	288,99 \pm 3,28	257,44 \pm 1,67	246,91 \pm 7,34
GH+T	286,76 \pm 2,19	276,96 \pm 1,00	250,25 \pm 7,31
100 °C			
GH	272,56 \pm 4,71	262,69 \pm 5,93	201,53 \pm 4,07
GH+S	261,44 \pm 2,72	251,32 \pm 3,51	206,98 \pm 7,37
GH+M	269,99 \pm 5,71	261,76 \pm 2,99	207,84 \pm 6,00
GH+T	285,88 \pm 3,20	280,99 \pm 8,04	211,57 \pm 2,34

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitivana je stabilnost i antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina. Antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina je uspoređena s katehinom i kvercetinom nakon pripreme uzoraka ali i tijekom skladištenja pod različitim uvjetima. Ujedno je ispitivan i utjecaj šećera (saharoze, maltoze i trehaloze) na antioksidativnu aktivnost glukozil hesperidina, te njihov utjecaj tijekom zagrijavanja na 60 °C, 80 °C i 100 °C.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Antioksidativna aktivnost glukozil hesperidina znatno je niža u odnosu na katehin i kvercetin bez obzira na primijenjenu metodu određivanja antioksidativne aktivnosti.
- Tijekom skladištenja pri različitim uvjetima došlo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti.
- Primjenom DPPH metode, otopini katehina se je najviše smanjila antioksidativna aktivnost, dok je smanjenje antioksidativne aktivnosti otopina glukozil hesperidina i kvercetina bilo podjednako.
- Primjenom ABTS i CUPRAC metoda, antioksidativna aktivnost katehina se je najviše smanjila dok je najmanja promjena utvrđena za otopinu glukozil hesperidina.
- Primjenom DPPH metode, najmanje promjene antioksidativne aktivnosti nakon mjesec dana skladištenja utvrđene su za otopinu glukozil hesperidina i glukozil hesperidina s dodatkom maltoze. Nakon 3 mjeseca skladištenja najmanja promjena antioksidativne aktivnosti utvrđena je za otopinu glukozil hesperidina, dok su uzorci s dodatkom šećera imali znatno veće promjene antioksidativne aktivnosti.
- Primjenom ABTS metode najmanje promjene antioksidativne aktivnosti nakon mjesec dana skladištenja utvrđene su za otopinu glukozil hesperidina i glukozil hesperidina s dodatkom maltoze. Nakon 3 mjeseca skladištenja pri sobnoj temperaturi na svjetlu i u tami, otopina glukozil hesperidina imala je znatno veće smanjenje antioksidativne aktivnosti u usporedbi s uzorcima s dodatkom šećera. Pri 4 °C promjene antioksidativne aktivnosti su bile podjednake.
- Prilikom zagrijavanja, najmanje smanjenje antioksidativne aktivnosti (DPPH) utvrđeno je za otopinu glukozil hesperidina, za sve ispitivane temperature. Produženjem vremena zagrijavanja utvrđeno je veće smanjenje antioksidativne aktivnosti.
- Prilikom zagrijavanja, najveće smanjenje antioksidativne aktivnosti (ABTS) utvrđeno je za otopinu glukozil hesperidina, za sve ispitivane temperature. Najmanje smanjenje

antioksidativne aktivnosti utvrđeno je za uzorak s dodatkom trehaloze, 60 °C. Produženjem vremena zagrijavanja pri 60 °C i 80 °C, utvrđeno je veće smanjenje antioksidativne aktivnosti, dok pri 100 °C utvrđen je suprotan trend.

- Primjenom DPPH metode, najmanje promjene antioksidativne aktivnosti nakon skladištenja utvrđene su za otopinu glukozil hesperidina.
- Rezultati pokazuju da je vrlo važna metoda koja se koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti, ali i da antioksidativna aktivnost ovisi o tipu šećera, načinu skladištenja te temperaturi zagrijavanja.

6. LITERATURA

- Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE: Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981, 2004.
- Arts MJTJ, Haenen GRMM, Voss HP, Bast A: Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food Chemical Toxicology*, 39, 787-791, 2001.
- Babić J: Utjecaj acetiliranja i dodataka na reološka i termofizikalna svojstva škroba kukuruza i tapioke. Disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Benzie IFF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'Antioxidant Power': The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 7076, 1996.
- Betoret E, Mannozi C, Dellarosa N, Laghi L, Rocculi P, Dalla Rosa M: Metabolomic studies after high pressure homogenization processed low pulp mandarin juice with trehalose addition. Functional and technological properties. *Journal of Food Engineering*, 200, 22-28, 2017.
- Blasco AJ, Rogerio MC, González MC, Escarpa A: "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods. A proposal. *Analytica Chimica Acta*, 539, 237-44, 2005.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M: Flavonoids as antioxidants: determination of radicalscavenging efficiencies. *Methods Enzymology*, 186, 343-355, 1990.
- Brand-Williams W., Cuvelier, M. E., Berset, C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30, 1995.
- Burda S, Oleszek W: Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:2774-2779, 2001.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG: Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radical Biology and Medicine*, 14, 303-311, 1993.
- Choi Y, Cho KW, Jeong K, Jung S: Molecular dynamics simulations of trehalose as a 'dynamic reducer' for solvent water molecules in the hydration shell. *Carbohydrate Research*, 341, 1020-1028, 2006.

- Colacço C, Roser B: Trehalose-a multifunctional additive for food preservation. U Food Packaging and Preservation, Blackie Professional, London, 1995.
- Dugas Jr. AJ, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW: Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. Journal of Natural Products, 63,327–331, 2000.
- Gharras HE: Polyphenols: food sources, properties and applications. International Journal of Food Science and Technology, 44,2512–2518, 2009.
- Gordon MH: The development of oxidative rancidity in foods. U Antioxidants in food, Woodhead Publishing Ltd, 2001.
- Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A: Peroxynitrite scavenging by flavonoids. Biochemical and Biophysical Research Communications, 236,591–593, 1997.
- Harborne JB, Williams CA: Advances in flavonoid research since 1992., Phytochemistry 55, 481-504, 2000.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry, 13,572–84, 2002.
- Heldman D, Lund D, Sabliov C: Handbook of Food Engineering, Second Edition. CRC Press. 2006.
- Hijiya, H., Miyake, T.: α -glycosyl hesperidin, and its preparation and uses. US patent 5,652,124, 1997.
- Huang W, Cai Y, Zhang Y: Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. Nutrition and Cancer, 62, 1-20, 2010.
- Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiva Higijene Rada i Toksikologije, 55,279-290, 2004.
- Knight JA: Diseases related to oxygen-derived free radicals. Annals of Clinical and Laboratory Science, 25, 111-121, 1995.

- Kopjar M: Utjecaj dodatka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda. Disertacija. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Kopjar M, Jakšić K, Piližota V: Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of blackberry juice during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36, 545-552, 2012.
- Kopjar M, Lončarić A, Mikulinjak M, Šrajbek Ž, Šrajbek M, Pichler A: Evaluation of Antioxidant Interactions of Combined Model Systems of Phenolics in the Presence of Sugars. *Natural Product Communications*, 11, 1445-1448, 2016.
- Kopjar M, Nedić Tiban N, Piližota V, Babić J: Stability of anthocyanins, phenols and free radical scavenging activity through sugar addition during frozen storage of blackberries. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 1-11, 2009.
- Kopjar M, Piližota V, Hribar J, Simčič M, Zlatič E, Nedić Tiban N: Influence of trehalose addition and storage conditions on the quality of strawberry cream filling. *Journal of Food Engineering*, 87, 341-350, 2008.
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM: Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 3592-3597, 1995.
- Lončarić A, Pichler A, Trtinjak I, Piližota V, Kopjar M: Phenolics and antioxidant activity of freeze-dried sour cherry puree with addition of disaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 391-396, 2016.
- Matthiesen L, Malterud KE, Sund RB: Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. *Free Radical Biology and Medicine*, 2, 307-311, 1997.
- Mattila P, Hellström, Törrönen: Phenolic acids in berries, fruits and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7193-7199, 2006.
- Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412, 1993

- Michalak, A: Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15, 523-530, 2006.
- Patist A, Zoerb H: Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*, 40, 107-113, 2005.
- Pichler A: Utjecaj dodataka i skladištenja na kvalitetu, reološka i termofizikalna svojstva paste od maline. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Pinto SS, Diogo HP, Moura-Ramos JJ: Crystalline anhydrous α,α -trehalose (polymorph β) and crystalline dihydrate α,α trehalose: A calorimetric study. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 38, 1130-1138, 2006.
- Pokorny J: Antioxidants in food, Publishing Ltd, 1-3, 2001.
- Rein MJ: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Disertacija. Sveučilište Helsinki, Helsinki, 2005.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 56-396, 1996.
- Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glower W: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruit. *Food Chemistry*, 66, 401-436, 1999.
- Robles-Sardin AE, Bolaños-Villar AV, González-Aguilar GA, Verónica A: Flavonoids and Their Relation to Human Health. U *Fruit and vegetable phytochemicals*. Wiley Blackwell, New Delhi, 2010.
- Saha RK, Takahashi T, Suzuki T: Glucosyl Hesperidin Prevents Influenza A Virus Replication in Vitro by Inhibition of Viral Sialidase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 1188–1192, 2009.
- Sekher Pannala A, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA: Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 1161–1168, 2001.
- Shi H, Noguchi N, Niki E: Introducing naturale antioxidants, *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing Ltd, str. 147-158, 2001.

- Skupien K, Oszmainski J,: Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research Technology*, 219, 66-70, 2004.
- Šubarić D, Babić J, Ačkar Đ: *Proizvodnja šećera*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Šubarić D, Kopjar M, Ačkar Đ: Polifenoli i zdravlje. Zbornik radova i sažetaka sa međunarodnog seminara „Dodaci prehrani u zdravlju i bolesti“. Tuzla, 32-39, 2010.
- Tsao R: Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients* 2(12), 1231-1246, 2010.
- Van Acker SABE, De Groot MJ, van den Berg DJ, Tromp MNJL, den Kelder GDO, van der Vijgh WJF, Bast A: A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoid. *Chemical Research in Toxicology*, 9,1305-1312, 1996.
- Van Dijak P, Colavizza D, Smet P, Thevelein JM: Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 109-115, 1995.
- Vennat B, Bos MA, Pourrat A, Bastide P: Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17,1613–1615, 1994.
- Vermerris W, Nicholson R: *Phenolic Compound Biochemistry*, University of florida, Gainesville, FL, U.S.A., Purdue University, West Lafayette, IN, U.S.A., Springer, 2006.
- Web 1
<http://www.nylearns.org/module/content/search/item/186/viewdetail.ashx#sthash.TB1xDG7f.dpbs>
- Web 2 <http://www.bqckit.com/product/abts-antioxidant-capacity-assay-kit-kf-01-002/>
- Web 3 https://www.researchgate.net/figure/268794877_fig1_Figure-1-Reaction-mechanism-of-22-diphenyl-1-picrylhydrazyl-DPPH-with-antioxidant-R
- Web 4 <https://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>
- Web 5 <http://www.standard-substance.com/products/Plant-Modifier/Hesperitin/>
- Web 6 <https://examine.com/supplements/hesperidin/>

Williamson G, Plumb GW, Garcia-Conesa MT: Glycosylation, esterification and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates: effects on antioxidant properties. *Basic Life Science*, 66,483–494, 1999.

Yamada M, Tanabe F, Arai N, Mitsuzumi H, Miwa Y, Kubota M, Chaen H, Kibata M: Bioavailability of Glucosyl Hesperidin in Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 1386–1394, 2006.